动 物 学 研 究 2004, Apr. 25 (2): 172 ~ 176 CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853
Zoological Research

梭子蟹科六种海产蟹的RAPD标记

金 珊，赵青松*，王春琳，陈寅儿
（宁波大学 生命科学与生物工程学院，浙江 宁波 315211）

摘要：选取日本蟳（普陀、嵊泗两个自然群体）、锈斑蟳、锐齿蟳、三疣梭子蟹、红星梭子蟹、青蟹共6种海产蟹，用RAPD方法检测了其基因组DNA的多态性。在事先优化的反应条件下，用16个随机引物共扩增出123条多态性片段，片段大小在500 ~ 14 000 bp。在123条扩增片段中，6种蟹共享的片段有2条，3种蟳有13条，2种梭子蟹有16条；6种蟹之间随机扩增DNA片段的共享度在0.0606 ~ 0.8000，相对遗传距离指数在0.2000 ~ 0.9394。根据获得的相对遗传距离指数，用PHYLIP 3.5软件包中的UPGMA和NJ方法进行聚类处理。UPGMA和NJ聚类图均显示三疣梭子蟹和红星梭子蟹先聚在一起，再和青蟹聚在一起。6种蟹的亲缘关系与传统的形态学分类结果基本一致。

关键词：RAPD；海产蟹类；基因组DNA；遗传标记
中图分类号：Q959.223 **文献标识码**：A **文章编号**：0254 - 5853(2004)02 - 0172 - 05

RAPD Genetic Markers in Six Species of Marine Crab

JIN Shan, ZHAO Qing-song*, WANG Chun-lin, CHEN Yin-er
(*Life Science and Biotechnology Faculty, Ningbo University, Ningbo* 315211, *China*)

Abstract: The phylogenetic relationship of six marine crabs was studied using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Predetermined optimal reaction conditions were as follows: Samples were first heated at 94 ℃ for 4 min; and followed by 45 cycles of 1 min at 94 ℃, 1 min at 36 ℃, and 2 min at 72 ℃ then held at 72 ℃ for 10 min. With 16 primers, 123 reproducible amplified fragments ranging between 500 and 14 000 bp were acquired. In all bands, 2 bands were shared by all crabs, 13 shared by *Charybdis japonica*, *C. acuta* and *C. feriatus*, 16 shared by *Portunus sanguinolentus* and *P. trituberculatus*. The amplified fragments were scored as present (1) or absent (0) for each DNA sample and an index of degree of band sharing (F) was calculated by using Nei and Li's matching coefficient method. The degree of F was 0.0606 - 0.8000. The value of 1 - F was used to evaluate genetic distances between species. The genetic distances between species were 0.2000 - 0.9394. The phylogenetic trees were constructed with the method of UPGMA and NJ on the basis of genetic distances. The results from the two methods of cluster analysis are similar in general, and the relationships indicated by the phylogenetic trees show the difference between genus species. The results are in good overall agreement with classical taxonomy.

Key words: RAPD; Marine crab; Genomic DNA; Genetic marker

梭子蟹科的蟹类为温暖海洋的重要经济蟹类，世界上现存大约250种，我国约60种（Du, 1991）。该科的很多种类都是著名的大型食用蟹类。在养殖过程中，来自于人工养殖的蟹苗数量有限，大部分依赖于自然海区捕捞。而捕捞的蟹苗很难根据形态结构加以区分，容易造成苗种混杂。因此，建立养殖蟹类的快速鉴定技术，成为充分利用天然蟹类资源、解决养殖中所面临的苗种混杂问题的当务之急。基于此，我们采用RAPD分子标记技术，对经济价值较高的梭子蟹科的6种海产蟹类进行分析，期望能为种质资源鉴定提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

收稿日期：2003 - 08 - 04；接受日期：2003 - 11 - 19
基金项目：浙江省自然科学基金资助项目（302440）；宁波市青年基金资助项目（2003A62013）
*通讯作者：(Corresponding author), E-mail: zhaoqs@nbip.net

实验用的蟹种分别是日本蟳（*Charybdis japonica*）、锐齿蟳（*C. acuta*）、锈斑蟳（*C. feriatus*）、红星梭子蟹（*Portunus sanguinolentus*）、三疣梭子蟹（*P. trituberculatus*）和锯缘青蟹（*Sylla serrata*），是来自浙江舟山海区的自然群体，每种各 10 只。活体运回实验室，解剖取其肌肉，用滤纸吸去水，放入离心管中，－71 ℃超低温冰箱中冷冻保存备用。

Mg^{2+}、dNTP、Buffer、Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司的产品。其余试剂购自上海生物工程公司。

1.2 DNA 提取及纯化

参考 Wei（1999）的方法进行常规饱和酚提取基因组 DNA。在蟹步足或大螯处取 100 mg 肌肉组织磨碎，加入 500 μL 匀浆缓冲液（10 mmol/L Tris-HCl；100 mmol/L EDTA，pH 值为 8.0；1% 的 SDS），然后加入 5～8 μL 10 mg/L 的蛋白酶 K，55 ℃消化过夜，然后分别用等体积的酚、酚和氯仿（1∶1）、氯仿和异戊醇（24∶1）抽提，2 倍体积乙醇沉淀，TE 溶解，置于 4 ℃保存备用。

1.3 PCR 反应

PCR 扩增在美国 Bio-Rad 公司 iCyclerTM Thermal Cycler DNA 热循环仪上进行。反应总体积为 25 μL，包含：1 × buffer［10 mmol/L Tris HCl（pH 8.3），50 mmol/L KCl］，2.5 mmol/L MgCl，0.2 μmol/L 引物，0.15 μmol/L dNTPs，25 ng 模板 DNA，1.5 U Taq 聚合酶。PCR 扩增程序参考 Williams（1990），反应条件为预 94 ℃变性 4 min；然后每个循环 94 ℃变性 1 min，36 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，循环 45 次；最后 72 ℃延伸 10 min。

1.4 电泳分析与观察

将扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶（含溴化乙锭－EB 0.5 mg/mL）中电泳分离，100 V 稳压 3 h，在紫外透射仪下观察并照相。

1.5 数据处理

记录电泳中清晰、有代表性的扩增带，有 DNA 扩增条带的记为“1”，无则记为“0”。

根据 DNA 在电场中的迁移率（d）与分子量（M）的对数成正比：$d = k\log M$，计算 DNA 片段大小。以 λDNA/*Eco*RⅠ + *Hin*dⅢ作为分子量标记，作图计算每个扩增片段大小。

根据 Nei & Li（1979）的公式：$F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$（其中 N_{xy} 是 XY 两个个体共有的扩增带，N_x、N_y 是 X 和 Y 个体分别拥有的扩增带），计算随机扩增多态性 DNA 片段的共享度 F（也称遗传相似指数 S_i）和两个个体间的平均遗传距离指数。

再根据遗传距离指数，用 PHYLIP3.5 版本软件包中的 UPGMA（unweighted pair group method with arithmetic mean）和 NJ（neighbor-joining）（Saitou & Nei，1987）方法进行聚类分析。

2 结果

2.1 DNA 扩增结果

用 22 个 10 碱基（表 1）随机对 6 种蟹基因组 DNA 进行扩增，22 个引物中 20 个引物有扩增产物。再选取其中 16 个扩增效果好的引物进一步分析后，共扩增出 123 个 DNA 片段。单个引物扩增出的产物为 3～14 个 DNA 片段，片段大小为 500～14 000 bp。在 123 条扩增片段中，共享的片段：6 种蟹只有 2 条，3 种蟳有 13 条，两种梭子蟹有 16 条。同一引物对不同蟹的扩增产物不同，不同引物对不同蟹基因组 DNA 的扩增产物也各不相同（图 1：A、B、C）。

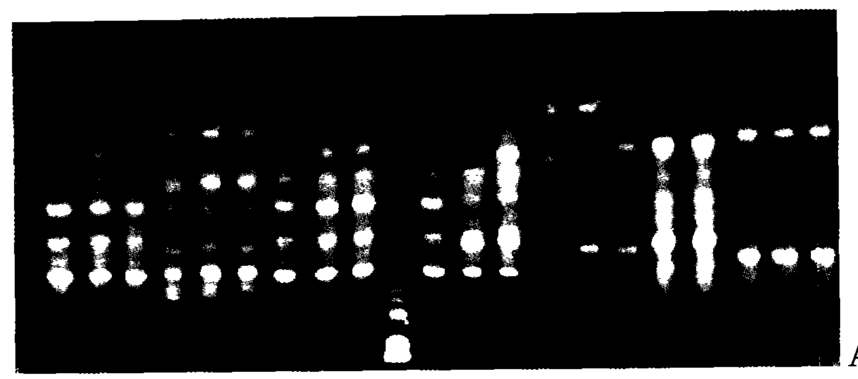
2.2 遗传距离及亲缘关系

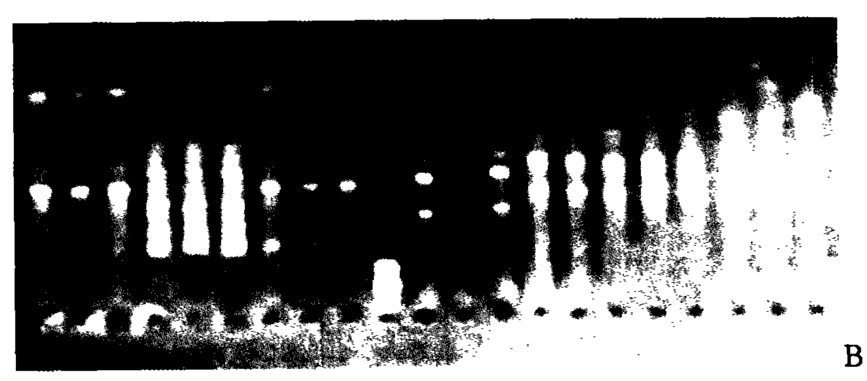
由 16 个引物的扩增条带数，计算出的 6 种蟹之间随机扩增 DNA 片段的共享度和相互间的遗传距离指数列于表 2。其共享度范围在 0.0606～0.8000，种内的共享度大，为 0.8000；同属不同种间的共享度小，蟳属的种间共享度在 0.4359～0.7750，梭子蟹属的种间共享度为 0.7273；不同属间的共享度最小，属间共享度在 0.0606～0.4000。UPGMA 聚类分析的结果显示：日本蟳的两个地理种群先聚在一起，然后和锐齿蟳、锈斑蟳聚在一起；三疣梭子蟹和红星梭子蟹先聚在一起，再和青蟹聚在一起。NJ 聚类分析结果虽与 UPGMA 有差别，但三疣梭子蟹和红星梭子蟹先聚在一起，再和青蟹聚在一起的结果却是一致的（图 2）。

3 讨论

在传统形态分类中，这 6 种蟹的所属及形态特征见表 3。UPGMA 和 NJ 聚类分析结果印证了梭子蟹属（*Portunus*）与青蟹属（*Sylla*）的关系较与蟳属（*Charybdis*）的关系更近的观点。

在扩增出的多态性片段中，共享片段的多少反映各物种的亲缘关系，亲缘关系较远的物种间共享





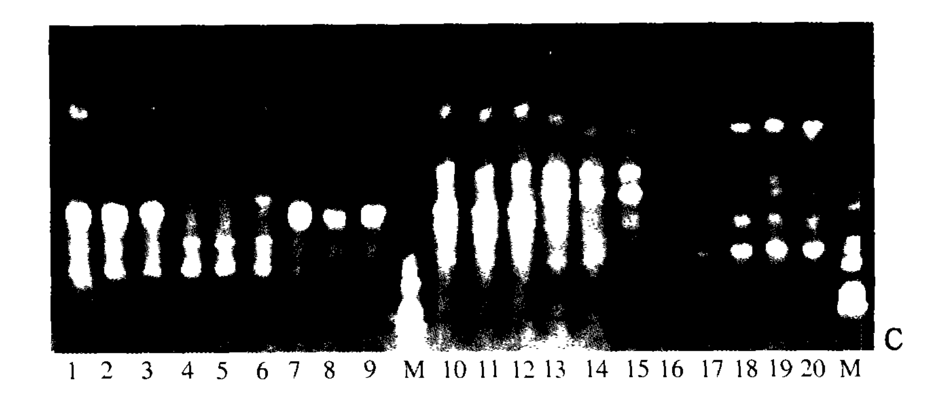


图 1 3种引物对6种蟹基因组DNA扩增产物的电泳图

Fig.1 RAPD amplified profiles generated by primers S382、S381 and S391 of six species of crabs

1~3：日本蟳 *Charybdis japonica*（普陀，Putuo）；4~6：锈斑蟳 *C. feriatus*；7~9：日本蟳 *C. japonica*（嵊泗，Shengsi）；10~12：锐齿蟳 *C. acuta*；13~15：三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus*；16~17：红星梭子蟹 *P. sanguinolentus*；18~20：青蟹 *Sylla serrata*。

A：S382；B：S381；C：S391。

片段较少，反之则较多（Zou，2001）。本文的结果同样证明了这一点：在扩增出的123条扩增片段中，6种蟹的共享片段有2条，3种蟳有13条，两种梭子蟹有16条。这些共享片段以及各物种的特征扩增片段对种质标准的确定以及种质鉴定技术的建立十分重要。同时进一步说明RAPD分析在海产蟹类的种质鉴定中是可行的，在系统发育和亲缘关系的研究中也是可行的。

表 1 RAPD 分析用的随机引物、序列及扩增结果

Table 1 RAPD primers and their sequences used during the analysis and the amplified results

引物 Primers	5′—3′序列 5′－3′sequences	总扩增带数 Total bands	引物 Primers	5′—3′序列 5′－3′sequences	总扩增带数 Total bands
S381	GGCATGACCT	7	S394	GTGACAGGCT	9
S382	TGGGCGTCAA	14	S395	AAGAGAGGGG	11
S384	GACTGCACAC	—	S396	AGGTTGCAGG	5
S385	ACGCAGGCAC	—	S397	AGCCTGAGCC	3
S386	GAGGGAAGAG	—	S398	ACCACCCACC	10
S387	AGGCGGGAAC	11	S399	GAGTGGTGAC	5
S388	AGCAGGTGGA	9	S400	TGGTGGACCA	7
S389	TGCGAGAGTC	—	S414	AGGGTCGTTC	5
S391	ACGATGAGCC	9	S447	CAGCACTGAC	5
S392	GGGCGGTACT	5	S477	TGACCCGCCT	—
S393	ACCGCCTGCT	8	S130	GGAAGCTTCC	—

表 2 6 种蟹随机扩增多态 DNA 片段的共享度（F）（左下角）和遗传距离指数（1－F）（右上角）

Table 2 Proportion of RAPD fragment shared（F）（below diagonal）and genetic distance（1－F）（above diagonal）among six species of crabs

	日本蟳 *C. japonica*（普陀，Putuo）	锈斑蟳 *C. feriatus*	日本蟳 *C. japonica*（嵊泗，Shengsi）	锐齿蟳 *C. acuta*	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	红星梭子蟹 *P. sanguinolentus*	青蟹 *S. serrata*
日本蟳 *C. japonica*（普陀，Putuo）		0.5641	0.2000	0.3494	0.8206	0.9394	0.7867
锈斑蟳 *C. feriatus*	0.4359		0.5200	0.5422	0.7436	0.8788	0.8400
日本蟳 *C. japonica*（嵊泗，Shengsi）	0.8000	0.4800		0.2250	0.8400	0.9048	0.7778
锐齿蟳 *C. acuta*	0.6506	0.4578	0.7750		0.7109	0.8592	0.7750
三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	0.1794	0.2564	0.1600	0.2891		0.2727	0.6000
红星梭子蟹 *P. sanguinolentus*	0.0606	0.1212	0.0952	0.1408	0.7273		0.6508
青蟹 *S. serrata*	0.2133	0.1600	0.2222	0.2250	0.4000	0.3492	1.0000

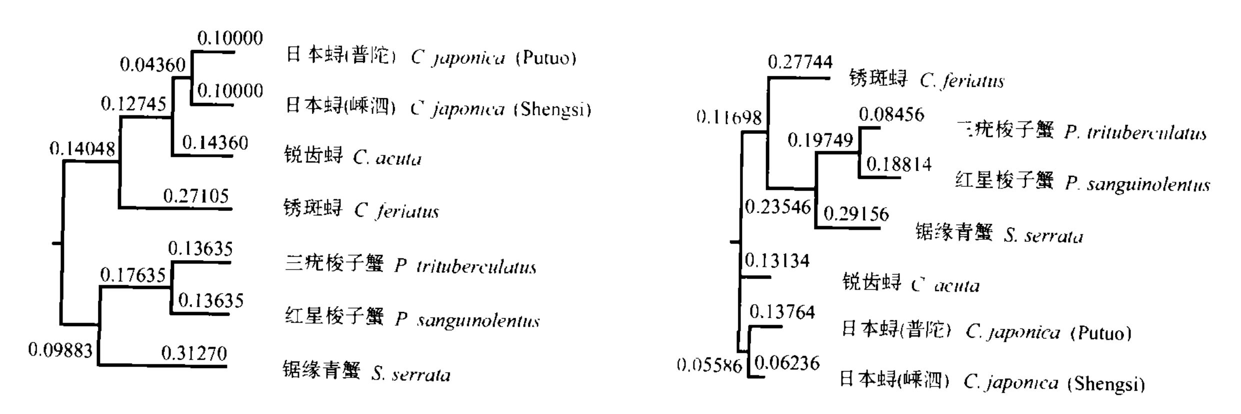


图 2 据遗传距离用 UPGMA 法（左）和 NJ 法（右）得到的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the genetic distance matrices with the method of UPGMA（left）and NJ（right）

表3 6种蟹的分类地位及形态特征

Table 3 Taxonomic status and morphological characteristics of six species of crabs

分类地位 Taxonomic status	形态特征 Morphological characteristics (Du, 1993; Wei & Chen, 1991)
蟳属 *Charybdis* 日本蟳 *C. japonica* 锐齿蟳 *C. acuta* 锈斑蟳 *C. feriatus*	第二触角基部一节的前外角明显扩大，成为一小片而充填眼眶，节鞭因此完全位于眼眶之外；前侧缘齿为7个或者少于7个。
梭子蟹属 *Portunus* 红星梭子蟹 *P. sanguinolentus* 三疣梭子蟹 *P. trituberculatus* 青蟹属 *Sylla* 锯缘青蟹 *S. serrata*	第二触角基部一节的前外角不明显突出，节鞭位于眼眶内；前侧缘具有7个以上的齿。

参考文献：

Du NS. 1993. Crustacea Zoology [M]. Beijing: Science Press. 675-914. [堵南山. 1993. 甲壳动物学. 北京：科学出版社. 675-914.]

Elo K, Ivanoff S, Vuorinen JA. 1997. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and *Atlantic salmon* [J]. *Aquaculture*, **152**: 55-65.

Nei M, Li WH. 1979. Mathematics mode for studying genetic variation in terms of restriction endorucleases [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 5269-5273.

Shen JR, Dai AY. 1964. Animal Atlas in China. Crustacea (second volume) [M]. Beijing: Science Press. 45-59. [沈嘉瑞，戴爱云. 1964. 中国动物图谱，甲壳动物（第二册）. 北京：科学出版社. 45-59.]

Wei CD, Chen YS. 1991. Fauna of Zhejiang (Crustacea) [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Publishing House. 349-368. [魏崇德，陈永寿. 1991. 浙江动物志（甲壳类）. 杭州：浙江科学技术出版社. 349-368.]

Wei Q. 1999. Molecular Biology Experiment Guidance [M]. Beijing: Higher Education Publishing Company. 66-68. [魏 群. 1999. 分子生物学实验指导. 北京：高等教育出版社. 66-68.]

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalaski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisims amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531-6535.

Zou YP, Ge S, Wang XD. 2001. The Analysis Mark in Systematic and Evolution Botany [M]. Beijing: Science Press. [邹喻苹，葛颂，王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分析标记. 北京：科学出版社. 245-250.]